



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
11 DE 3927061 A1

21 Aktenzeichen: P 39 27 061.0
22 Anmeldetag: 16. 8. 89
43 Offenlegungstag: 8. 3. 90

51 Int. Cl. 5:
C 12 N 1/21
C 12 N 1/15
C 12 N 15/63
C 07 H 21/04
C 12 P 19/34
C 12 P 21/02
// (C12P 21/02,
C12R 1:19,1:85,1:38,
1:465)C07K 3/02

Best Available Copy

DE 3927061 A1

C12 N9/06

30 Unionspriorität: 32 33 31

17.08.88 JP 203239/88

71 Anmelder:

Sapporo Breweries, Ltd., Tokio/Tokyo, JP; Toyo
Boseki K.K., Osaka, JP

73 Vertreter:

Vossius, V., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Tauchner, P.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Heunemann, D., Dipl.-Phys.
Dr.rer.nat.; Rauh, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Hermann, G., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Schmidt, J.,
Dipl.-Ing.; Jaenichen, H., Dipl.-Biol. Dr.rer.nat.,
Pat.-Anwälte; Tremmel, H., Rechtsanw., 8000
München

72 Erfinder:

Shigyo, Tatsuro; Sugihara, Kohji; Takamoto, Yuji;
Takashio, Masachika; Kamimura, Minoru, Yaizu,
Shizuoka, JP; Yamamoto, Kazumi; Kojima, Yoshio;
Kikuchi, Toshio; Emi, Shigenori, Tsuruga, Fukui, JP

DOC

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Uricase-codierende DNA-Sequenzen und Verfahren zur Herstellung von Uricase

Beschrieben werden DNA-Sequenzen, die ein Protein mit
der biologischen Aktivität von Uricase codieren. Ferner wer-
den rekombinante Plasmide beschrieben, die die genannten
DNA-Sequenzen enthalten, sowie damit transformierte Mi-
kroorganismen. Schließlich wird ein gentechnologisches
Verfahren zur Herstellung von Proteinen mit der biologi-
schen Aktivität von Uricase beschrieben.

DE 3927061 A1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die ein Protein mit der biologischen Aktivität von Uricase codieren. Ferner betrifft die Erfindung rekombinante Plasmide, die die genannten DNA-Sequenzen enthalten, Transfor-

manten, die die genannten rekombinanten Plasmide enthalten, und gentechnologische Verfahren zur Herstel-

lung von Uricase.

Uricase (EC 1, 7, 3, 3) ist ein Enzym, das die hydrolytische Umsetzung von Harnsäure in Allantoin, Wasserstoff-

peroxid und Kohlendioxid katalysiert. Es wird beim Nachweis von Harnsäure in Blut oder Urin verwendet.

Bisher wurde Uricase durch Züchtung eines Uricase-bildenden Mikroorganismus in einem Kulturmedium, beispielsweise von Mikroorganismen der Gattung Candida in Gegenwart von Harnsäure, und Isolierung der Uricase aus dem Kulturmedium hergestellt; vgl. JP-PS 5 192/1 967. Dieses Verfahren weist jedoch den Nachteil auf, daß das Enzym nur mit niedriger Ausbeute erhalten wird.

Somit liegt der Erfindung das technische Problem zugrunde, ein Verfahren zur kostengünstigen Herstellung von Uricase in hohen Ausbeuten und die darin zu verwendenden Werkzeuge bereitzustellen.

Die Lösung des der Erfindung zugrunde liegenden technischen Problems wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erzielt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung wird somit DNA-Sequenzen, die ein Uricase-codierendes Gen enthalten.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner DNA-Sequenzen aus *Bacillus* sp. TB-90 (FERM BP-795, JP-A 61-2 80 272), die eine Uricase mit der folgenden Aminosäure-Sequenz codieren:

10	20	
MetThrLysHisLysGluArgValMetTyr	TyrGlyLysGlyAspValPheAlaTyrArg	
30	40	5
ThrTyrLeuLysProLeuThrGlyValArg	ThrIleProGluSerProPheSerGlyArg	
50	60	
AspHisIleLeuPheGlyValAsnValLys	IleSerValGlyGlyThrLysLeuLeuThr	10
70	80	
SerPheThrLysGlyAspAsnSerLeuVal	ValAlaThrAspSerMetLysAsnPheIle	
90	100	15
GlnLysHisLeuAlaSerTyrThrGlyThr	ThrIleGluGlyPheLeuGluTyrValAla	
110	120	
ThrSerPheLeuLysLysTyrSerHisIle	GluLysIleSerLeuIleGlyGluGluIle	
130	140	20
ProPheGluThrThrPheAlaValLysAsn	GlyAsnArgAlaAlaSerGluLeuValPhe	
150	160	25
LysLysSerArgAsnGluTyrAlaThrAla	TyrLeuAsnMetValArgAsnGluAspAsn	
170	180	
ThrLeuAsnIleThrGluGlnGlnSerGly	LeuAlaGlyLeuGlnLeuIleLysValSer	
190	200	30
GlyAsnSerPheValGlyPheIleArgAsp	GluTyrThrThrLeuProGluAspSerAsn	
210	220	
ArgProLeuPheValTyrLeuAsnIleLys	TrpLysTyrLysAsnThrGluAspSerPhe	35
230	240	
GlyThrAsnProGluAsnTyrValAlaAla	GluGlnIleArgAspIleAlaThrSerVal	
250	260	40
PheHisGluThrGluThrLeuSerIleGln	HisLeuIleTyrLeuIleGlyArgArgIle	
270	280	
LeuGluArgPheProGlnLeuGlnGluVal	TyrPheGluSerGlnAsnHisThrTrpAsp	45
290	300	
LysIleValGluGluIleProGluSerGlu	GlyLysValTyrThrGluProArgProPro	
310	320	50
TyrGlyPheGlnCysPheThrValThrGln	GluAspLeuProHisGluAsnIleLeuMet	
330		
PheSerAspGluProAspHisLysGlyAla	LeuLys	55

Der vorstehend genannte Stamm von *Bacillus* sp. bildet eine Temperatur-beständige Uricase und wurde von den Erfindern aus der Natur isoliert. Er ist bei der bezeichneten japanischen Hinterlegungsstelle nach den Vorschriften des Budapester Vertrages hinterlegt.

Ein rekombinantes Plasmid, das die vorstehend genannte DNA-Sequenz enthält, ist erhältlich durch Herstellung einer Genbank mit der chromosomalen DNA von *Bacillus* sp. TB-90, Absuchen der Genbank mit Kaninchen-anti-Uricase-Antikörpern, Isolierung eines rekombinanten Phagen, der die bezeichnete DNA-Sequenz enthält, Isolierung eines DNA-Fragments aus dem Phagen, der die bezeichnete DNA-Sequenz enthält, und Einbau des genannten DNA-Fragments in ein Plasmid.

Bekannterweise werden Aminosäuren in der Regel von mehr als einem Codon codiert. Dies wird als "Degeneration des genetischen Codes" bezeichnet. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit auch alle durch die Degeneration des genetischen Codes verwendeten DNA-Sequenzen, die eine Uricase mit der vorstehend

angegebenen Aminosäure-Sequenz codieren. Da diese DNA-Sequenzen auch synthetischer Herkunft sein können, ist die vorliegende Erfindung nicht auf natürlich vorkommende DNA-Sequenzen beschränkt.
In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße DNA-Sequenz die folgende:

```

5      ATGACCAAAC ACAAAGAAAG AGTGATGTAT TATGGAAAAG GTGACGTATT TGCTTATCGC
                                     100
      ACCTATTTAA AACCACCTTAC TGGAGTTAGA ACGATTCTCG AATCTCCATT TTCCGGTCCA .
10
      GATCATATTC TTTTGGAGT AAATGTAAAA ATCTCAGTAG GAGGAACAAA ATTGCTGACC
                                     200
15     TCCTTTACGA AAGGGGATAA CAGCTTAGTC GTTGCAACAG ACTCGATGAA AAACTTTATA
                                     300
      CAAAAACATT TAGCTAGTTA TACAGGAACA ACGATAGAAG GTTTTTTAGA ATATGTAGCT
20
      ACTTCTTTTT TGAAGAAATA TTCTCATATT GAAAAGATTT CGTTGATAGG AGAGGAAATT
                                     400
25     CCCTTTGAAA CAACTTTTGC AGTAAAGAAT GGAAATAGAG CAGCTAGTGA GCTAGTATTT
      AAAAAATCAC GAAATGAATA TCCACCGCT TATTTGAATA TGGTTCGTAA TGAAGATAAC
30
      ACCCTAAACA TTAAGTGAACA ACAAAGCGGA CTTGCTGGTC TTCAATTAAT AAAAGTCAGC
                                     500
      GGAAATTCCT TTGTGGGTTT TATTCGTGAC GAATACACAA CTCTCCAGA GGATTCAAAC
35
      CGCCCTCTAT TTGTTTACTT AAACATCAAA TGGAAGTACA AAAACACGGA AGACTCATTT
                                     600
40     GGAACGAATC CAGAAAATTA TGTTCAGCT GAACAAATTC GCGACATCCG CACGTCCGTA
      TTTATGAAA CCGAGACGCT TTCCATCCAA CATTTAATTT ATTTAATCGG CCGAAGAATA
45
      TTAGAAAGAT TCCCTCAACT TCAAGAAGTT TACTTCCAAT CTCAAAATCA TACATGGGAT
                                     800
50     AAAATAGTGG AGGAAATTC TGAATCAGAA GGGAAAGTAT ATACAGAACC GCGACCGCCA
      TATCGATTTC AATGCTTTAC TGTCACCCAA GAAGACTTGC CACACGAAAA CATTCTTATC
55
      TTCTCTGATG AACCCGATCA TAAAGGAGCA CTAAATGA
                                     999

```

Die vorstehend genannte DNA-Sequenz kann aus *Bacillus* sp. TB-90 (FERM BP-795) wie vorstehend angegeben erhalten werden.

Die Erfindung betrifft ferner DNA-Sequenzen, die unter üblichen Bedingungen mit einer der vorstehend genannten DNA-Sequenzen hybridisieren und ein Protein mit der biologischen Aktivität von Uricase codieren. Übliche Hybridisierungsbedingungen sind solche, bei denen der T_m -Wert zwischen etwa T_m-20 und T_m-27 liegt. Stringente Hybridisierungsbedingungen werden bevorzugt.

Durch DNA-Rekombinationsverfahren lassen sich beliebige künstliche Variationen an bestimmten Stellen einer Ausgangs-DNA-Sequenz einführen, ohne dabei die grundsätzlichen Eigenschaften des von der DNA-Sequenz codierten Proteins zu verändern. Andererseits können solche Variationen eingefügt werden, um die

Eigenschaften des codierten Proteins zu verbessern. Somit betrifft die Erfindung auch Modifikationen der vorstehend genannten DNA-Sequenzen, die künstliche Insertionen, Deletionen oder Substitutionen aufweisen und somit Gene repräsentieren, die zum natürlich vorkommenden Gen äquivalente oder sogar verbesserte Eigenschaften besitzen. DNA-Sequenzen, die wie angegeben unter üblichen Bedingungen mit einer der vorstehend genannten DNA-Sequenzen hybridisieren, können in üblicher Weise nicht nur aus *Bacillus* sp. TB-90, sondern auch aus anderen Mikroorganismen isoliert werden.

Erfindungsgemäß lassen sich die bezeichneten DNA-Sequenzen durch DNA-Rekombinations-Verfahren isolieren. Auf diese Weise lassen sich auch DNA-Sequenzen isolieren, die eine Uricase codieren, die stabiler ist als die bisher hergestellte Uricase.

In einer erfindungsgemäß bevorzugten Ausführungsform stammen die vorstehend bezeichneten DNA-Sequenzen aus einem Mikroorganismus.

In einer weiteren erfindungsgemäß bevorzugten Ausführungsform weisen die vorstehend genannten DNA-Sequenzen die mit ihnen natürlicherweise assoziierten regulatorischen Elemente der 5'-Flanke und 3'-Flanke auf.

Ferner betrifft die Erfindung rekombinante Plasmide, die die vorstehend genannten DNA-Sequenzen enthalten.

Expressionsvektoren, mit denen die *Bacillus* sp. TB-90-Uricase in *Escherichia coli*-Zellen hergestellt werden kann, können durch Ligierung des *Bacillus* sp. TB-90-Uricase-Gens mit einem für *E. coli* geeigneten Expressionsvektor hergestellt werden. Beispiele solcher Expressionsvektoren sind pUC18 (Toyobo), der den *lac*-Promotor enthält, pKK223-3 (Pharmacia), der einen wirkungsvollen *E. coli*-Promotor enthält, nämlich den natürlichen *trp*-Promotor und den Terminator der ribosomalen *rrnB*-RNA, pDR720 (Pharmacia), der den *tac*-Promotor enthält, oder der induzierbare pL-lambda-Expressionsvektor (Pharmacia). Ferner betrifft die Erfindung rekombinante Plasmide, mit denen die *Bacillus* sp. TB-90-Uricase in *Bacillus subtilis*-Zellen oder im entsprechenden Kulturmedium hergestellt werden kann. Dazu wird eine der vorstehend bezeichneten DNA-Sequenzen beispielsweise mit dem Shuttle-Vektor pHY300PLK (Toyobo) (geeignet für *Bacillus subtilis* oder *Escherichia coli*) oder mit dem Plasmid-Vektor pUB110 (J. Bacteriol. 134 (1978), 318—329) ligiert.

Die Erfindung betrifft außerdem Transformanten, die mindestens eines der vorstehenden rekombinanten Plasmide enthalten.

Transformanten, die Uricase intrazellulär oder extrazellulär bilden können, lassen sich durch Einführen der vorstehend beschriebenen rekombinanten Plasmide in Mikroorganismen, vorzugsweise in Wirtszellen, wie *Escherichia coli* oder *Bacillus subtilis*, herstellen.

Außerdem sind nicht nur *Escherichia coli*- oder *Bacillus subtilis*-Wirts/Vektor-Systeme verfügbar, sondern auch *Saccharomyces* sp.- *Pseudomonas* sp.- oder *Streptomyces* sp.-Wirts/Vektor-Systeme. Erfindungsgemäß wird somit die Herstellung von Uricase unter Berücksichtigung der jeweiligen Vorteile der genannten Wirts/Vektor-Systeme durchgeführt.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Transformante ein transformierter Mikroorganismus, der zur Art *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces* sp., *Pseudomonas* sp. oder *Streptomyces* sp. gehört und mindestens eines der vorstehend erläuterten Plasmide enthält, das oder die für die Transformante heterologe DNA-Sequenzen enthalten, die ebenfalls vorstehend beschrieben wurden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Transformante ein Mikroorganismus, der zur Art *Escherichia coli* oder *Bacillus subtilis* gehört.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Transformante der Mikroorganismus *E. coli* JM109 (pUOD316), *E. coli* JM109 (pKU1), *Bacillus subtilis* ISW1214 (pEB2) oder eine Variante dieser Mikroorganismen. Diese Mikroorganismen sind beim "Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry" unter den Hinterlegungsnummern FERM BP-1979, FERM BP-1980 bzw. FERM BP-1981 nach den Vorschriften des Budapester Vertrages hinterlegt worden.

Schließlich betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Uricase, bei dem man eine der erfindungsgemäßen Transformanten in einem Medium unter zur Expression der Uricase-codierenden DNA-Sequenz geeigneten Bedingungen züchtet und die bei der Expression der DNA-Sequenz anfallende Uricase aus der Kultur isoliert. Beispielsweise läßt sich Uricase in einem solchen Verfahren in guter Ausbeute durch Zugabe des Induktors Isopropylthiogalaktosid (IPTG) in einem frühen Stadium der Züchtung der Transformante herstellen. Nach der Züchtung der Transformante läßt sich die Uricase beispielsweise durch Behandlung der Zellen mit Lysozym oder durch Lysieren der Zellen durch eine Ultraschallbehandlung, oder durch Extraktion, Trennung und Reinigung des Kulturmediums isolieren.

Die Figuren zeigen

Fig. 1 zeigt die Uricase-codierende DNA-Sequenz aus *Bacillus* sp. TB-90 und die entsprechende Aminosäure-Sequenz.

Fig. 2 zeigt die Konstruktion der Expressionsplasmide pUOD316 und pKU1 aus dem rekombinanten *E. coli*-Plasmid pUOD31, das eine Uricase-codierende DNA-Sequenz aus *Bacillus* sp. TB-90 enthält. Die schwarzen und weißen Kästchen stellen ein das Uricase-Gen enthaltendes DNA-Fragment bzw. den Bereich des *lac*- oder *trp*-Promotors dar. Der Begriff "Ligierung" bedeutet eine Ligierungsreaktion von DNA-Fragmenten mit T4 DNA-Ligase.

Fig. 3 zeigt die Konstruktion des rekombinanten *Bacillus subtilis*-Plasmids pEB2, das eine Uricase-codierende DNA-Sequenz aus *Bacillus* sp. TB-90 enthält. Die schwarzen und weißen Kästchen und der Begriff "Ligierung" haben dieselbe Bedeutung wie in Fig. 2.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Clonierung eines Uricase-Gens

Schritt 1

Herstellung von Kaninchen-anti-Uricase-Antikörpern

Zur Herstellung von Kaninchen-anti-Uricase-Antikörpern (Antiseren) wurde ein Kaninchen mit durch Extraktion und Reinigung eines Kulturmediums von *Bacillus* sp. TB-90 (FERM BP-795) erhaltener Uricase immunisiert. Der Titer des Antiserums betrug 10^2 bis 10^3 , gemessen nach dem ELISA-Verfahren, bzw. Faktor 16, gemessen nach dem Ouchterlony-Verfahren. Sodann wurde das Antiserum gereinigt. Dabei wurden 10 ml Antiserum einer Säulenchromatographie mit Protein A-Sepharose (4 ml) unterworfen. Es wurden 8,9 ml anti-Uricase-Antikörper vom Typ IgG erhalten.

Schritt 2

Herstellung einer genomischen Genbank von *Bacillus* sp. TB-90

Bacillus sp. TB-90 wurde in Fleischbrühe-Medium (flüssiges Medium (pH 7,2), 5 g Fleischextrakt, 10 g Pepton und 5 g NaCl auf ein Gesamtvolumen von 1 Liter) gezüchtet. Sodann wurde chromosomale DNA aus 2,5 g der Zellen isoliert; vgl. R. H. Doi, "Recombinant Techniques", Herausgeber Rodriguez et al., Addison-Wesley Publishing Company, 1983, Seite 162 oder J. Koizumi et al., Biotech. Bioeng. 27 (1985), Seiten 721–728.

Dabei wurden 900 µg gereinigte chromosomale DNA erhalten (OD_{260}/OD_{280} = etwa 1,8). Sodann wurde die erhaltene chromosomale DNA mit dem Restriktionsenzym *Sau3A*I in üblicher Weise partiell gespalten und einer Dichtegradienten-Zentrifugation (5 bis 20% Saccharose) unterzogen, wobei DNA-Fraktionen mit 2 bis 20 kb erhalten wurden.

1 µg Arme des λ -Phagen-Clonierungsvektors EMBL3 (Toyobo) wurden mit 0,4 µg der vorstehend erhaltenen, mit *Sau3A*I partiell gespaltenen chromosomalen DNA vermischt, mit 1 Einheit T4 DNA-Ligase (Toyobo) ligiert und mit einem in vitro-"Packaging-kit" (Gigapack Gold, Toyobo) verpackt. Mit den erhaltenen Phagen wurde *E. coli* Q 359 (Toyobo) infiziert und so ausplattiert, daß 2000 Plaques pro Platte erhalten wurden.

Schritt 3

Selektion von rekombinanten Phagen, die das Uricase-Gen enthalten (Isolierung eines Clons mit einem Uricase-Gen durch Plaque-Hybridisierung)

Das in Schritt 1 erhaltene, gereinigte IgG wurde mit Meerrettich-Peroxidase (HRPO) vermischt, um ein IgG-HRPO-Konjugat zu erhalten. Mit diesem Konjugat wurde unter Verwendung eines Gen-Expressions-Kit (Boehringer Mannheim) ein Clon mit einem Uricase-Gen isoliert. Die Nachweisempfindlichkeit betrug dabei 100 pg DNA. Beim Absuchen der Phagen-Genbank ergaben positive Clone eine blaugrüne Farbe. Es wurden stark gefärbte Clone selektiert und die entsprechenden Phagen gereinigt, bis bei einer Infektion alle Plaques gefärbt waren. Somit wurden die Phagen 1 und 3 isoliert. Mit diesen Phagen wurde *E. coli* Q359 infiziert und der Überstand des jeweiligen Kulturmediums wurde auf Uricase-Aktivität geprüft. Es wurden 7 mU/ml bzw. 9 mU/ml erhalten.

Schritt 4

Identifizierung des Uricase-Gens von *Bacillus* sp. TB-90

Aus den vorstehend erhaltenen positiven Clonen 1 und 3 wurde in üblicher Weise Phagen-DNA isoliert; vgl. "Molecular Cloning", Herausgeber Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A. 1982, Seite 85. Sodann wurden die Phagen-DNA's mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sall* gespalten und einer Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel unterzogen. Die Analyse ergab, daß in den Phagen 1 und 3 ein 18 kb bzw. ein 15 kb *Sall*-DNA-Fragment inseriert ist.

Außerdem wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Sph*I und *Kpn*I eine Restriktionskarte der in die Phagen 1 und 3 inserierten DNA erstellt. Sodann wurde DNA des Phagen 1 mit dem Restriktionsenzym *Sall* gespalten und das inserierte 18 kb DNA-Fragment aus einem Agarosegel extrahiert (Yoshiyuki Sakaki, "Vektor DNA", Kohdansha, Seite 67). In einer Hybridisierungsanalyse nach Southern mit dem 18 kb Fragment als Sondenmolekül (J. Mol. Biol., 98 (1975), Seiten 503–517) wurde gezeigt, daß das 18 kb DNA-Fragment des Phagen 1 nicht nur mit dem 15 kb DNA-Fragment des Phagen 3, sondern auch mit chromosomaler DNA von *Bacillus* sp. TB-90 hybridisiert. Daraus folgte, daß die DNA der eine Uricase-Aktivität induzierenden Phagen 1 und 3 einen gemeinsamen Bereich enthält und weiter, daß in die DNA der beiden Phagen ein von der chromosomalen DNA von *Bacillus* sp. TB-90 abgeleitetes DNA-Fragment inseriert ist.

Sodann wurde aus DNA des Phagen 3 nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren das 15 kb DNA-Fragment isoliert, mit *Sall*-gespaltenem Plasmid-Vektor pUC18 ligiert und subcloniert. Auf diese Weise konnte die Lage des Uricase-Gens in der Insertion des Phagen 3 ermittelt und einem 4,8 kb *Bam*HI-*Sph*I-Fragment zugeordnet werden, das im Plasmid pUOD31 enthalten ist. Die Restriktionskarte dieses Plasmids ist in Fig. 2

oben in der Mitte abgebildet.

Sodann wurde die DNA-Sequenz des Uricase-Gens ermittelt. Dazu wurde das vorstehend genannte DNA-Fragment mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten und in die Vektoren pUC18 und 19 subcloniert. Danach wurden Plasmid-DNA's nach Birnboim und Doly hergestellt; vgl. Nucleic Acids Res. 7 (1979), Seiten 1513—1523. Die so erhaltene DNA wurde in 18 µl TE-Puffer (10 mM Tris-Salzsäure, pH 7,4, 1 mM EDTA) suspendiert, mit 2 µl 2 N NaOH vermischt, 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen, mit 8 µl 5 M Ammoniumacetat gemischt und zur Äthanol-fällung mit 100 µl kaltem Äthanol vermischt. Die DNA-Sequenz der Insertionen der so erhaltenen Plasmid-DNAs wurde mit einem M13-Sequenzierungs-Kit (Toyobo) und $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP (400 Ci/mMol, Amersham Japan) ermittelt.

Die so bestimmte DNA-Sequenz des Uricase-Gens von *Bacillus* sp. TB-90 weist einen codierenden Bereich von 999 Nucleotiden auf, der bei einem ATG als Startcodon beginnt und mit einem TGA als Stopcodon endet. Von diesem codierenden Bereich werden somit 332 Aminosäuren codiert; vgl. Fig. 1.

Beispiel 2

Konstruktion des Expressionsplasmids pUOD316 und pKU1 zur Expression des Uricase-Gens von *Bacillus* sp. TB-90 in *Escherichia coli*-Zellen

10 µg des das Uricase-Gen enthaltenden rekombinanten Plasmids pUOD 31 wurden mit EcoRI und HincII in 30 µl M-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol und 50 mM NaCl) 2 Stunden bei 37°C gespalten und das Reaktionsgemisch einer Elektrophorese in 0,8%igem Agarosegel enthaltend 0,1 µg/ml Äthidiumbromid unterworfen. Dann wurde das 1,4 kb EcoRI-HincII-DNA-Fragment isoliert.

Sodann wurde 1 µg DNA der Expressionsvektoren pUC18 (Toyobo) oder pKK223-3 (Pharmacia) mit EcoRI und HincII bzw. mit EcoRI und SmaI gespalten und DNA-Fragmente einer Größe von 2,7 kb bzw. 4,6 kb wie vorstehend beschrieben isoliert.

Sodann wurde 1 µg des wie vorstehend hergestellten 1,4 kb EcoRI-HincII-DNA-Fragments mit jeweils 1 µg des wie vorstehend beschriebenen hergestellten Fragments der Expressions-Vektoren pUC18 oder pKK223-3 vermischt und mit 5 Einheiten T4 DNA-Ligase (Toyobo) in 45 µl Ligase-Reaktions-Puffer (66 mM Tris-HCl (pH 7,6), 6,6 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol und 1,0 mM ATP) 6 Stunden bei 16°C ligiert.

Mit den erhaltenen Ligierungsprodukten wurde *Escherichia coli* JM109 (Takara Shuzo) nach dem Verfahren von Hanahan transformiert; vgl. J. Mol. Biol. 166 (1983), S. 557. Die Transformanten wurden auf L-Medium-Agar ausplattiert (10 g Trypton (Difco), 5 g Hefeextrakt (Difco), 5 g NaCl, 15 g pulverförmiger Agar in 1 Liter destilliertem Wasser (pH 7,2)), der mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt war. Es wurde auf Ampicillin-Resistenz selektiert. Plasmid-DNA wurde nach dem Verfahren von Birnboim und Doly hergestellt und mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen gespalten. Die Restriktionsfragment-Analyse mit einer Agarosegel-Elektrophorese zeigte eine richtige Insertion eines 1,4 kb EcoRI-HincII-DNA-Fragments in den entsprechenden Expressions-Vektoren. Der auf pUC18 basierende rekombinante Expressions-Vektor wurde als pUOD316 und der auf pKU1 basierende als pKK223-3 bezeichnet. Fig. 2 zeigt das Konstruktionsschema der Expressions-Vektoren pUOD316 und pKU1 aus dem rekombinanten Plasmid pUOD31.

Herstellung von Uricase in *Escherichia coli*

Die wie vorstehend konstruierten Expressions-Plasmide pUOD316 und pKU1 wurden jeweils in *Escherichia coli* JM109 nach dem Verfahren von Hanahan eingeführt. Die von den erhaltenen Transformanten *E. coli* JM109/pUOD316 und JM109/pKU1 hergestellte Uricase wurde jeweils identifiziert und wie nachstehend angegeben untersucht.

Jede der Transformanten von *E. coli* wurde in flüssigem L-Medium über Nacht bei 37°C gezüchtet. Sodann wurden 0,1 ml der Kultur entnommen und 10 ml L-Medium wurden damit angeimpft und bei 37°C gezüchtet. Sobald der OD₆₆₀ einen Wert von 0,2 erreicht hatte, wurde Isopropylthiogalactosid (IPTG) bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Nachdem die Anzucht dann weitere 16 Stunden durchgeführt wurde, wurden 1,0 ml des Kulturmediums entnommen, mit 0,5 ml Extraktionspuffer (50 mM Borat-Puffer (pH 8,0), 10 mM EDTA · 3 Na, 0,3% Triton X-100 und 0,3% Lysozym) vermischt, 10 Minuten bei 37°C inkubiert und 10 Minuten bei 12 000 UpM zentrifugiert, so daß ein Bakterienlysat (Überstand) erhalten wurde. 20 µl des so erhaltenen Lysats wurden in derselben Menge Probenauftragungs-Puffer (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% Glycerin, 5% 2-Mercaptoäthanol und 0,001% BPB) suspendiert, 5 Minuten auf 100°C erhitzt und einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Laemmli et al. unterzogen; vgl. Nature, 227 (1970), Seiten 680—685. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie-Brillantblau gefärbt, entfärbt, getrocknet und auf einem Filterpapier befestigt. Es wurde eine Uricase-Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 35 000 bei *E. coli* JM109 nachgewiesen, die ein Expressions-Plasmid enthielten. Diese Protein-Bande reagierte spezifisch mit anti-Uricase-Antikörpern (IgG). Durch Messung der Protein-Bande auf dem Gel mit einem Densitometer wurde festgestellt, daß *E. coli* JM109/pUOD316 und JM109/pKU1 Uricase in einer Menge von jeweils 1% bzw. 3% des intrazellulären Gesamtproteins bilden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die *E. coli*-Transformanten die Uricase von *Bacillus* sp. TB-90 wirksam herstellten. *E. coli* JM109/pUOD316 wurde beim Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry, unter der Hinterlegungsnummer FERM BP-1979 und *E. coli* JM109/pKU1 unter der Hinterlegungsnummer FERM BP-1980 hinterlegt.

Die wie vorstehend beschriebene erhaltene Uricase weist die folgenden Merkmale auf:

(1) Biologische Aktivität:

Sie katalysiert die Umsetzung, bei der Harnsäure oxidativ abgebaut wird, so daß Wasserstoffperoxid freigesetzt wird.

(2) pH-Optimum: 5—10.

(3) pH-Stabilitätsbereich: 5—9.

(4) Temperatur-Optimum: 45—50°C.

(5) Temperatur-Stabilitätsbereich:

Durch eine 10minütige Behandlung bei 50°C vermindert sich die Uricase-Aktivität nicht.

(6) Substrat-Spezifität:

Die Uricase weist eine Substrat-Spezifität für Harnsäure auf.

Beispiel 3

Konstruktion des rekombinanten Plasmids pEB2 zur Expression des Uricase-Gens in *Bacillus subtilis*

Nach dem in Beispiel 2 beschriebenen Verfahren wurde das das Uricase-Gen enthaltende 3,0 kb BamHI-BglII-Fragment aus dem rekombinanten *E. coli*-Plasmid pUOD31 isoliert. Sodann wurden 2 µg des *E. coli*-*Bacillus subtilis* "shuttle"-Vektors pHY300 PLK (Toyobo) mit dem Restriktionsenzym BamHI gespalten, mit 2 µg des das Uricase-Gen enthaltenden 3,0 kb BamHI-BglII-Fragments unter Verwendung von 2 Einheiten T4 DNA-Ligase ligiert und *E. coli* C600 wurde nach dem Verfahren von Hanahan mit den Ligierungsprodukten transformiert. Ampicillin-resistente Stämme wurden auf L-Agar selektiert. Aus einem der transformierten *E. coli* C600-Stämme, der eine Uricase-Aktivität aufwies, wurde nach dem Verfahren von Birnboim et al. das Plasmid pEB2 isoliert. Fig. 3 zeigt ein Konstruktionsschema dieses Plasmids. Sodann wurden kompetente Zellen von *Bacillus subtilis* ISW 1214 (Toyobo) mit diesem Plasmid nach Rodriguez et al., (Herausgeber, Recombinant DNA Techniques, Addison-Wesley Publishing Company, 1983, Seiten 184—186) transformiert. Die Zellen wurden auf L-Agar enthaltend 15 µg/ml Tetracyclin und 0,2% Glucose ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Selektion Tetracyclin-resistenter Kolonien wurde ein mit dem rekombinanten Plasmid pEB2 transformierter Stamm von *Bacillus subtilis* isoliert. Diese Transformante wurde in L-Medium, enthaltend 15 µg/ml Tetracyclin und 0,2% Glucose über Nacht bei 37°C gezüchtet und das Plasmid wurde isoliert und nach Rodriguez et al., (Herausgeber, Recombinant DNA Techniques, Addison-Wesley Publishing Company, 1983, Seiten 164—165) isoliert und extrahiert. Das Plasmid dieser Transformante wurde mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen gespalten und einer Elektrophorese auf einem Agarosegel unterzogen. Dadurch wurde bestätigt, daß es das Uricase-Gen enthaltende 3,0 kb BamHI-BglII-Fragment trägt. Eine *Bacillus subtilis*-Transformante, nämlich die Transformante *Bacillus subtilis* ISW1214/pEB2 wurde beim Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry, unter der Hinterlegungsnummer FERM BP-1981 hinterlegt.

Herstellung von Uricase in *Bacillus subtilis*-Zellen

Bacillus subtilis ISW1214/pEB2 (FERM BP-1981) wurde in L-Medium enthaltend 15 µg/ml Tetracyclin und 0,2% Glucose über Nacht bei 37°C gezüchtet. Sodann wurden 1,0 ml des Kulturmediums entnommen und 5 Minuten bei 8000 UpM zentrifugiert, um den Überstand von den Zellen abzutrennen. Die Zellen wurden in 1,0 ml Extraktions-Puffer suspendiert, 10 Minuten bei 37°C inkubiert und 10 Minuten bei 12 000 UpM zentrifugiert, um ein Zellysat zu erhalten. Sodann wurden jeweils 20 µl des Kultur-Überstandes und des Zell-Lysats mit jeweils 20 µl des vorstehend genannten Proben-Auftrags-Puffers vermischt, 5 Minuten auf 100°C erhitzt und einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach dem Verfahren von Laemmli et al. unterzogen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie-Brillantblau gefärbt, entfärbt, getrocknet und auf einem Filterpapier befestigt. Dabei wurde sowohl für den Kulturüberstand als auch das Zellysat von *Bacillus subtilis* ISW1214/pEB2 eine Uricase-Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 35 000 ermittelt. Diese Protein-Bande zeigte eine spezifische Kreuzreaktion mit anti-Uricase-Antikörpern (IgG). Durch Untersuchung der Protein-Bande mit einem Densitometer wurde ferner festgestellt, daß *Bacillus subtilis* ISW1214/pEB2 0,6% Uricase pro intrazellulärem Gesamt-Protein herstellt. Außerdem wurden 40% der von den Zellen hergestellten Uricase in den Kultur-Überstand sezerniert, also extrazellulär hergestellt. Somit wurde gefunden, daß die Transformante *Bacillus subtilis* ISW1214/pEB2 Uricase sowohl intrazellulär als auch extrazellulär herstellt.

Patentansprüche

1. DNA-Sequenz, die ein Uricase-codierendes Gen enthält.

2. DNA-Sequenz nach Anspruch 1, die aus *Bacillus* sp. TB-90 (FERM BP-795) abgeleitet ist und eine Uricase mit der folgenden Aminosäure-Sequenz codiert:

10	20	
MetThrLysIleLysGluArgValMetTyr	TyrGlyLysGlyAspValPheAlaTyrArg	
30	40	5
ThrTyrLeuLysProLeuThrGlyValArg	ThrIleProGluSerProPheSerGlyArg	
50	60	10
AspHisIleLeuPheGlyValAsnValLys	IleSerValGlyGlyThrLysLeuLeuThr	
70	80	
SerPheThrLysGlyAspAsnSerLeuVal	ValAlaThrAspSerMetLysAsnPheIle	
90	100	15
GlnLysHisLeuAlaSerTyrThrGlyThr	ThrIleGluGlyPheLeuGluTyrValAla	
110	120	20
ThrSerPheLeuLysLysTyrSerHisIle	GluLysIleSerLeuIleGlyGluGluIle	
130	140	
ProPheGluThrThrPheAlaValLysAsn	GlyAsnArgAlaAlaSerGluLeuValPhe	
150	160	25
LysLysSerArgAsnGluTyrAlaThrAla	TyrLeuAsnMetValArgAsnGluAspAsn	
170	180	30
ThrLeuAsnIleThrGluGlnGlnSerGly	LeuAlaGlyLeuGlnLeuIleLysValSer	
190	200	
GlyAsnSerPheValGlyPheIleArgAsp	GluTyrThrThrLeuProGluAspSerAsn	
210	220	35
ArgProLeuPheValTyrLeuAsnIleLys	TrpLysTyrLysAsnThrGluAspSerPhe	
230	240	40
GlyThrAsnProGluAsnTyrValAlaAla	GluGlnIleArgAspIleAlaThrSerVal	
250	260	
PheHisGluThrGluThrLeuSerIleGln	HisLeuIleTyrLeuIleGlyArgArgIle	
270	280	45
LeuGluArgPheProGlnLeuGlnGluVal	TyrPheGluSerGlnAsnHisThrTrpAsp	
290	300	
LysIleValGluGluIleProGluSerGlu	GlyLysValTyrThrGluProArgProPro	
310	320	50
TyrGlyPheGlnCysPheThrValThrGln	GluAspLeuProHisGluAsnIleLeuMet	
330		55
PheSerAspGluProAspHisLysGlyAla	LeuLys	

3. DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2, die die folgende DNA-Sequenz ist:

ATGACCAAAC ACAAGAAAG AGTGATGTAT TATGCAAAAG GTGACGTATT TGCTTATCGC
 100
 ACCTATTTAA AACCATTAC TGGAGTTAGA ACGATTCCTG AATCTCCATT TTCCGGTCCA
 5
 GATCATATTC TTTTGGAGT AAATGTAATA ATCTCAGTAG GAGGAACAAA ATTGCTGACC
 200
 TCCTTTACGA AAGGGGATAA CAGCTTAGTC GTTGCAACAG ACTCGATGAA AAACTTTATA
 10
 CAAAAACATT TAGCTAGTTA TACAGGAACA ACGATAGAAG GTTTTTTAGA ATATGTAGCT
 300
 ACTTCTTTTT TGAAGAAATA TTCTCATATT GAAAAGATTT CGTTGATAGG AGAGGAAATT
 15
 CCCTTTGAAA CAACTTTTGC AGTAAAGAAT GGAAATAGAG CAGCTAGTGA GCTAGTATTT
 400
 AAAAAATCAC GAAATGAATA TGGCACCCTT TATTTGAATA TGGTTCGTAA TGAAGATAAC
 25
 ACCCTAAACA TTAAGTGAACA ACAAGCGGA CTTGCTGGTC TTCAATTAAT AAAAGTCAGC
 500
 GGAAATTCCT TTGTCGGTTT TATTCGTGAC GAATACACAA CTCTCCAGA GGATTCAAAC
 600
 CGCCCTCTAT TTGTTTACTT AAACATCAAA TGGAAGTACA AAAACACGGA AGACTCATT
 35
 GGAACGAATC CAGAAAATTA TGTTCAGCT GAACAAATTC GCGACATCGC CACGTCCGTA
 700
 TTTCATGAAA CCGAGACGCT TTCCATCCAA CATTTAATTT ATTTAATCGG CCGAAGAATA
 40
 TTAGAAAGAT TCCCTCAACT TCAAGAAGTT TACTTCGAAT CTCAAAATCA TACATGGGAT
 800
 AAAATAGTGG AGGAAATTCC TGAATCAGAA GGGAAAGTAT ATACAGAACC GCGACCGCCA
 900
 TATGGATTTC AATGCTTTAC TGTCACCCAA GAAGACTTGC CACACGAAAA CATTCTTATG
 50
 TTCTCTGATG AACCCGATCA TAAAGGAGCA CTTAAATGA
 999
 55

4. DNA-Sequenz, die komplementär zu einer DNA-Sequenz ist, die unter üblichen Bedingungen mit einer DNA-Sequenz nach Anspruch 2 oder 3 hybridisiert, und ein Protein mit der biologischen Aktivität von Uricase codiert.

5. DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 oder 4, die aus einem Mikroorganismus stammt.

6. DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5, die zusätzlich die natürlicherweise damit assoziierten regulatorischen Elemente der 5'- und 3'-Flanke aufweist.

7. Rekombinantes Plasmid, das eine DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 6 enthält.

8. Transformante, die ein rekombinantes Plasmid nach Anspruch 7 enthält.

9. Transformante nach Anspruch 8, die zur Art *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces sp.*, *Pseudomonas sp.* oder *Streptomyces sp.* gehört und ein Plasmid nach Anspruch 7 enthält, das eine für ihn heterologe DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 6 enthält.

10. Transformante nach Anspruch 8, die zur Art *Escherichia coli* oder *Bacillus subtilis* gehört.

11. Transformante nach einem der Ansprüche 8 bis 10, die der Mikroorganismus *Escherichia coli* JM109 (pUOD316), *Escherichia coli* JM109 (pKU1), *Bacillus subtilis* ISW1214 (pEB2) oder eine Variante davon ist.
12. Verfahren zur Herstellung von Uricase, bei dem man eine Transformante nach einem der Ansprüche 8 bis 11 in einem Medium unter zur Expression der Uricase-codierenden DNA-Sequenz geeigneten Bedingungen züchtet und die bei der Expression der DNA-Sequenz anfallende Uricase aus der Kultur isoliert.

5

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

FIG. 3

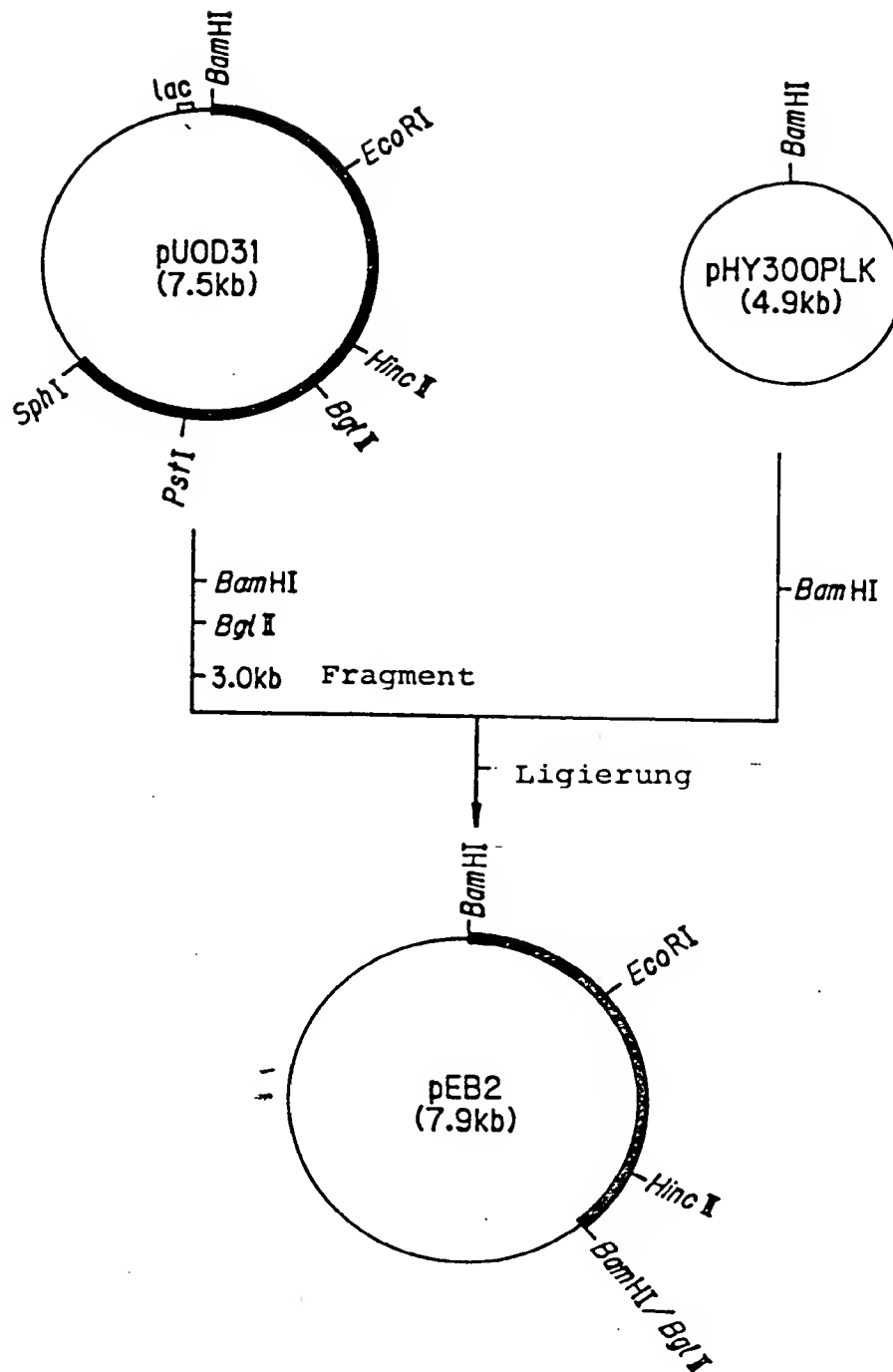


FIG. 1(A)

10
 ATG ACC AAA CAC AAA GAA AGA GTG ATG TAT TAT GGA
 Met Thr Lys His Lys Glu Arg Val Met Tyr Tyr Gly

20
 AAA GGT GAC GTA TTT GCT TAT CGC ACC TAT TTA AAA CCA CTT ACT GGA GTT AGA
 Lys Gly Asp Val Phe Ala Tyr Arg Thr Tyr Leu Lys Pro Leu Thr Gly Val Arg

40
 ACG ATT CCT GAA TCT CCA TTT TCC GGT CGA GAT CAT ATT CTT TTT GGA GTA AAT
 Thr Ile Pro Glu Ser Pro Phe Ser Gly Arg Asp His Ile Leu Phe Gly Val Asn

50
 GTA AAA ATC TCA GTA GGA GGA ACA AAA TTG CTG ACC TCC TTT ACG AAA GGG GAT
 Val Lys Ile Ser Val Gly Gly Thr Lys Leu Leu Thr Ser Phe Thr Lys Gly Asp

60
 AAC AGC TTA GTC GTT GCA ACA GAC TCG ATG AAA AAC TTT ATA CAA AAA CAT TTA
 Asn Ser Leu Val Val Ala Thr Asp Ser Met Lys Asn Phe Ile Gln Lys His Leu

70
 GCT AGT TAT ACA GGA ACA ACG ATA GAA GGT TTT TTA GAA TAT GTA GCT ACT TCT
 Ala Ser Tyr Thr Gly Thr Thr Ile Glu Gly Phe Leu Glu Tyr Val Ala Thr Ser

80
 TTT TTG AAG AAA TAT TCT CAT ATT GAA AAG ATT TCG TTG ATA GGA GAG GAA ATT
 Phe Leu Lys Lys Tyr Ser His Ile Glu Lys Ile Ser Leu Ile Gly Glu Glu Ile

90
 CCC TTT GAA ACA ACT TTT GCA GTA AAG AAT GGA AAT AGA GCA GCT AGT GAG CTA
 Pro Phe Glu Thr Thr Phe Ala Val Lys Asn Gly Asn Arg Ala Ala Ser Glu Leu

100
 GTA TTT AAA AAA TCA CGA AAT GAA TAT GCC ACC GCT TAT TTG AAT ATG GTT CGT
 Val Phe Lys Lys Ser Arg Asn Glu Tyr Ala Thr Ala Tyr Leu Asn Met Val Arg

110
 AAT GAA GAT AAC ACC CTA AAC ATT ACT GAA CAA CAA AGC GGA CTT GCT GGT CTT
 Asn Glu Asp Asn Thr Leu Asn Ile Thr Glu Gln Gln Ser Gly Leu Ala Gly Leu

120
 CAA TTA ATA AAA GTC AGC GGA AAT TCC TTT GTC GGT TTT ATT CGT GAC GAA TAC
 Gln Leu Ile Lys Val Ser Gly Asn Ser Phe Val Gly Phe Ile Arg Asp Glu Tyr

130
 ACA ACT CTT CCA GAG GAT TCA AAC CGC CCT CTA TTT GTT TAC TTA AAC ATC AAA
 Thr Thr Leu Pro Glu Asp Ser Asn Arg Pro Leu Phe Val Tyr Leu Asn Ile Lys

140
 TGG AAG TAC AAA AAC ACG GAA GAC TCA TTT GGA ACG AAT CCA GAA AAT TAT GTT
 Trp Lys Tyr Lys Asn Thr Glu Asp Ser Phe Gly Thr Asn Pro Glu Asn Tyr Val

150
 160
 170
 180
 190
 200
 210
 220

FIG. 2

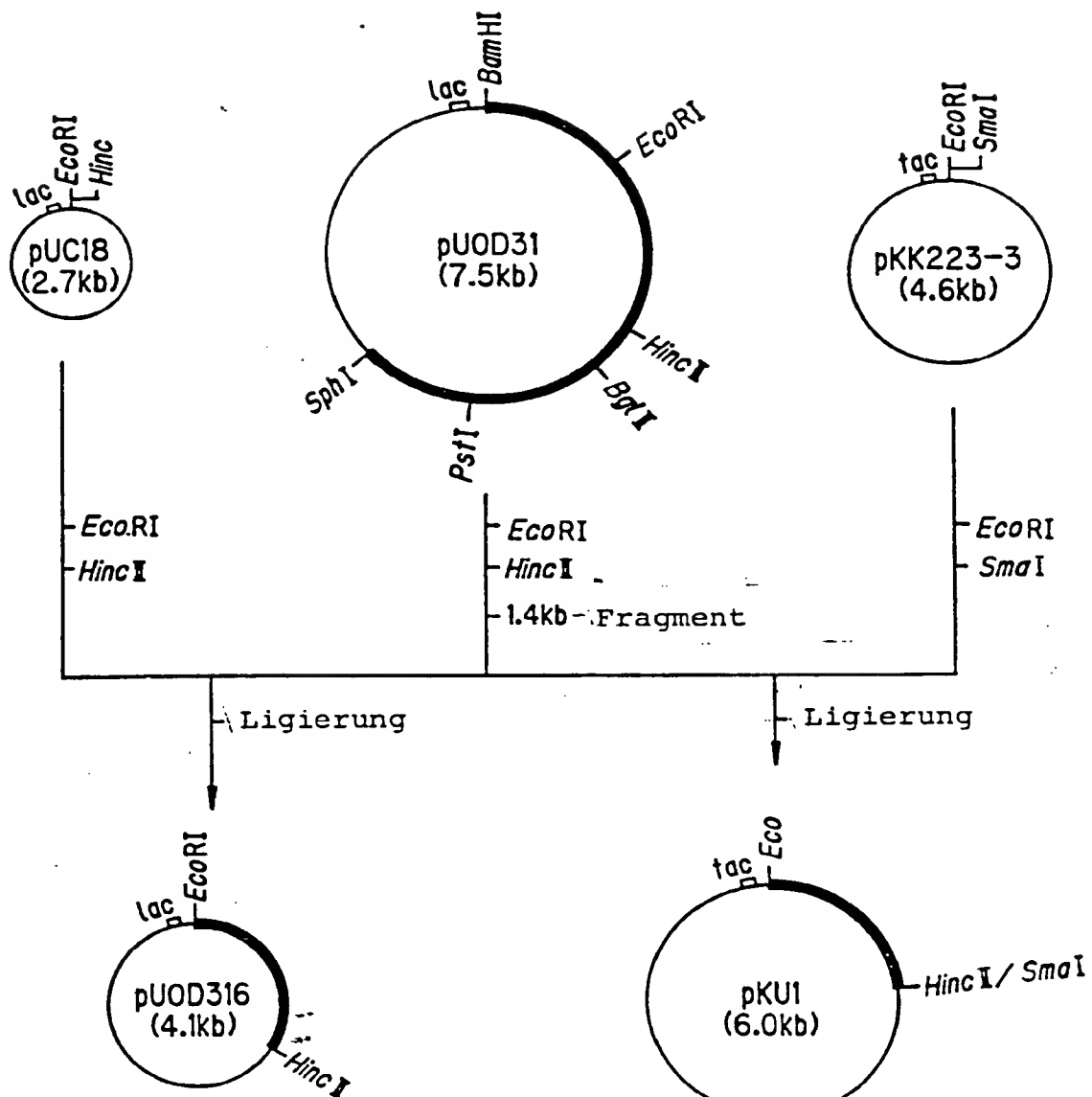


FIG. 1(B)

230 240
GCA GCT GAA CAA ATT CGC GAC ATC GCC ACG TCC GTA TTT CAT GAA ACC GAG ACG
Ala Ala Glu Gln Ile Arg Asp Ile Ala Thr Ser Val Phe His Glu Thr Glu Thr

250 260
CTT TCC ATC CAA CAT TTA ATT TAT TTA ATC GGC CGA AGA ATA TTA GAA AGA TTC
Leu Ser Ile Gln His Leu Ile Tyr Leu Ile Gly Arg Arg Ile Leu Glu Arg Phe

270 280
CCT CAA CTT CAA GAA GTT TAC TTC GAA TCT CAA AAT CAT ACA TGG GAT AAA ATA
Pro Gln Leu Gln Glu Val Tyr Phe Glu Ser Gln Asn His Thr Trp Asp Lys Ile

290 300
GTG GAG GAA ATT CCT GAA TCA GAA GGG AAA GTA TAT ACA GAA CCG CGA CCG CCA
Val Glu Glu Ile Pro Glu Ser Glu Gly Lys Val Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Pro

310
TAT GGA TTT CAA TGC TTT ACT GTC ACC CAA GAA GAC TTG CCA CAC GAA AAC ATT
Tyr Gly Phe Gln Cys Phe Thr Val Thr Gln Glu Asp Leu Pro His Glu Asn Ile

320 330
CTT ATG TTC TCT GAT GAA CCC GAT CAT AAA GGA GCA CTT AAA TGA
Leu Met Phe Ser Asp Glu Pro Asp His Lys Gly Ala Leu Lys ***

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)